

HPLC法测定附子山茱萸联合给药后大鼠心肌组织中磷酸腺苷、磷酸肌酸和肌酐

陈桂江¹, 贾欢欢¹, 李云峰¹, 梁金强¹, 曾业文¹, 关业枝^{1, 2*}

1. 广东省实验动物监测所, 广东 广州 510660

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510660

摘要: 目的 建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定附子山茱萸联合给药后大鼠心肌组织中三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)、磷酸肌酸(PCr)和肌酐5种物质含量的方法,用于慢性心衰大鼠心肌组织样品能量物质的测定。方法 考察色谱条件(色谱柱、流动相、柱温、检测波长、进样量、洗脱梯度和洗脱时间等);评价该方法的精密度、线性和回收率、检测限与定量限、稳定性等。结果 专属性、线性、精密度、回收率、稳定性均良好,能满足后续研究的需要。动物给药后能量物质均有不同程度升高,且联合给药效果更显著。结论 方法检测结果可靠、操作简便;检测方法可用于慢性心衰大鼠心肌组织样品能量物质的测定。

关键词: 高效液相色谱; 大鼠; 心肌组织; 三磷酸腺苷; 磷酸肌酸

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)12-2248-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.021

Determination of adenosine phosphate, creatine phosphate and creatinine in rat myocardial tissue by HPLC

CHEN Guijiang¹, JIA Huanhuan¹, LI Yunfeng¹, LIANG Jinqiang¹, ZENG Yewen¹, GUAN Yezhi^{1,2}

1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510660, China

Abstract: **Objective** Establish a method for the simultaneous determination of five substances (ATP, ADP, AMP, PCr and creatinine) in myocardium of rats by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The chromatographic conditions (column, mobile phase, column temperature, detection wavelength, injection volume, elution gradient and elution time) were investigated. The method was evaluated for precision, linearity and recovery, limit of detection and limit of quantization, stability, and so on. **Results** Specificity, linearity, precision, recovery and stability were all good, which could meet the need of follow-up study. After administration, the energy and substance of animals all have different degrees of increase. **Conclusion** The method is reliable and easy to operate. The detection method can be used for the determination of energy substances in myocardial tissue of chronic heart failure rats.

Key words: HPLC; rat; myocardium; ATP; PCr

心脏是机体主要耗能器官之一,由于其永不停息地工作,需要消耗机体将近90%以上的三磷酸腺苷(ATP)能量,ATP为心肌的收缩和舒张提供能量。能量代谢是心肌细胞活动的物质基础,心肌组织中磷酸腺苷[通常指ATP、二磷酸腺苷(ADP)和一磷酸腺苷(AMP)]以及磷酸肌酸(phosphocreatine, PCr)

的含量变化直接反映心肌能量代谢状况。通常通过测定心肌组织中的PCr、肌酐(creatinine)、ATP及其代谢产物ADP、AMP的含量变化,可判断心肌缺血的程度,有助于评价药物是否对心肌缺血有改善或保护作用^[1]。

本研究在参考俞海伦^[2]、孙蕊^[3]、陈艳芳^[4]实验

收稿日期: 2018-03-10

基金项目: 广东省自然科学基金(N0.2016A030313646); 广东省科技计划项目(广东省实验动物与动物实验技术综合创新平台建设(一期), 2017A070702001)

*通信作者: 关业枝(1977—),女,副研究员,硕士生导师,主要从事药物非临床评价研究。E-mail: gyz@gdlami.com

基础上,采用HPLC法,通过考察流动相和色谱柱等色谱条件,建立同时测定大鼠心肌组织中ATP、ADP、AMP、PCr和肌酐5种物质含量的方法,并用于慢性心衰大鼠心肌组织样品的测定。

1 实验方法

1.1 仪器设备

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪(配自动相样器、柱温箱和二极阵列检测器);赛多利斯® CPA225D 电子分析天平;BECKMAN® L-100XP 超高速冷冻离心机;昆山® KQ-300DE 数控超声清洗器;西安莫吉娜® SHZ-III A 循环水多用真空泵;MERCK MILLIPORE® Milli-Q Reference 超纯水仪;IKA® VORTEX Genivs 3 漩涡混合器。

1.2 试剂及对照品

试剂:默克色谱甲醇(批号 I866507650);磷酸二氢钠(批号 20170102-1)、磷酸氢二钠(批号 20170503-1),分析纯,广州化学试剂厂提供;高氯酸(批号 2016041),分析纯,天津市鑫源化工有限公司提供。实验用水为 Milli-Q 纯水仪自制超纯水。

对照品:磷酸肌酸钠(批号 100875-201302)、肌酸(批号 100876-200901)、三磷酸腺苷二钠(批号 140674-200401)、二磷酸腺苷二钠(批号 140809-201501)、一磷酸腺苷钠(批号 14719-200501)、肌酐(批号 100877-200901)均由中国食品药品检定研究院提供。

附子提取物、山茱萸提取物、附子+山茱萸提取物均由成都大学提供。

1.3 动物来源及实验方法

实验动物为SD大鼠,180~220 g,雄性,购自广东省医学实验动物中心,实验动物质量合格证 NO.44007200042740。给予SD大鼠腹腔注射阿霉素制备慢性心衰大鼠模型。随机分成4组(每组10只),即模型组、附子提取物组、山茱萸提取物组、附子+山茱萸提取物组,另设空白组。除模型组和空白组给予纯净水外,其余组分别ig给予附子提取物、山茱萸提取物、附子+山茱萸提取物,连续给药4周。

1.4 色谱条件

安捷伦 1260 Infinity II 液相分析系统。Agilent AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相:A 为 10 mmol/L 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠组成的磷酸盐缓冲液(磷酸调节 pH 至 6.2),B 为纯甲醇。样品盘温度 15℃。色谱温度 15℃。检测波长 210 nm。进样体积 20 μL。梯度洗脱分离:① 0~5 min,

100%A, 体积流量 0.5 mL/min;② 5~7 min, 100%A, 体积流量 0.5~0.7 mL/min;③ 7~22 min, A 逐渐减少到 30%;④ 后运行平衡 8 min。

1.5 样品前处理

大鼠给药后,麻醉安乐死解剖,取部分心肌组织,用液氮速冻,称质量,每 100 mg 心肌组织加入 0.5 mL 预冷的 0.4 mol/L 高氯酸,冰水浴条件下用 2 mL 玻璃组织研磨器匀浆,以 12 000 r/min 低温(4℃ 以下)离心 15 min,取上清液,按体积 1:1 加入 0.67 mol/L 磷酸氢二钠溶液调节 pH 值为 6~7.5,取上清液存于 -80℃ 冰箱。高效液相色谱测定时,取出解冻后,用 0.45 μm 针头过滤器过滤至液相小瓶中,放入仪器样品盘中,仪器自动进样器按顺序进样 20 μL^[2]。

1.6 数据统计

采用 SPSS19.0 对数据进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 专属性

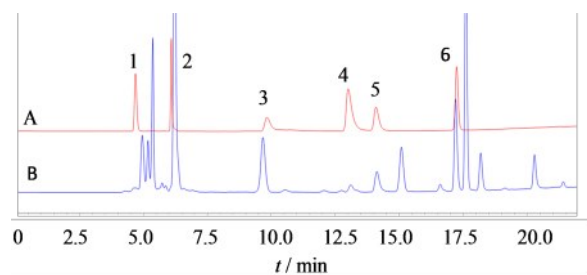
用 1 mL 刻度吸管各取 1 mg/mL 磷酸肌酸钠对照品储备液、1 mg/mL 肌酸对照品储备液、1 mg/mL 肌酐对照品储备液、1 mg/mL 三磷酸腺苷二钠对照品储备液、0.85 mg/mL 二磷酸腺苷二钠、1 mg/mL 一磷酸腺苷钠对照品储备液各 1 mL 置 50 mL 量瓶中,用流动相(A:B=7:3)稀释混合对照品溶液。

在实验室色谱条件下,取混合对照品溶液与心肌组织样品溶液进样分析,心肌组织色谱图中各目标物质峰形良好,未知物质峰与目标峰分离度良好,各物质峰纯度扫描其纯度因子均在 995.000 以上,说明各目标物质峰专属性良好,心肌组织中其他未知物质对目标物质检测无干扰。前期预实验发现,由于部分心肌样品中,肌酸在该色谱条件下的色谱柱中几乎无保留,在前面溶剂峰处出峰,与其他未知峰分不开,因此,该项研究中未将肌酸纳入考察范围。混合对照品溶液与心肌组织样品的典型谱图如图 1 所示。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 检测波长的确定 前期预试过程中,各目标物质最大紫外吸收波长扫描发现 ATP、ADP、AMP 最大吸收波长为 254 nm,但 PCr、肌酐在该波长下基本无吸收峰,综合发现这 5 种物质在 210 nm 处均有较大的吸收峰,最终本实验采用 210 nm 作为检测波长。

2.2.2 色谱柱的确定 前期预实验发现,PCr、肌酸在普通 C₁₈ 色谱柱中,在含有有机相的流动相系统中



1-肌酸;2-PCr;3-ATP;4-肌酐;5-ADP;6-AMP
1- Creatine; 2-PCr; 3-ATP; 4-Creatinine; 5-ADP; 6-AMP

图1 混合对照品(A)和心肌样品(B)色谱图

Fig.1 Specificity chromatogram of mixed references (A) and myocardial samples (B)

基本无保留,洗脱梯度前期需用100%水相开始梯度洗脱,方可获得较为满意的分离效果。参照俞海伦等^[2]的实验结果、结合本实验室条件和前期预实验结果,最终采用Agilent AQ-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)亲水柱进行实验。

2.2.3 柱温 在选定的流动相条件下,选择柱温

10、15、20、25℃进行实验,结果表明,随着柱温降低,各组分的色谱峰分离度明显提高。但随着柱温降低,ATP峰形变差。在综合考虑生物样品的特殊性 & 研究需要,最终确定柱温为15℃。

2.2.4 体积流量 分别以1.0、0.7、0.5 mL/min等度洗脱和先0.5 mL/min等度后0.7 mL/min梯度、先0.6 mL/min等度后0.8 mL/min梯度洗脱进样。实验结果表明,体积流量越低,各组分保留时间延长,分离度越好;但体积流量降低ATP、ADP峰形变矮变宽。因此,最终确定先等度后梯度(先0.5 mL/min等度、后0.7 mL/min梯度)的洗脱方式进行检测。

2.3 方法建立及验证

2.3.1 线性范围、检测限与定量限 配制不同浓度的对照品溶液进样后,测定峰面积与浓度的线性关系。结果表明:各目标物质在线性范围内相关系数 R^2 均大于0.985,线性良好;检测限、定量限较低,能满足后续研究的需要。实验结果见表2。

表2 各组分含量与峰面积的线性关系及其检测限

Table 2 Each component content and peak area of the linear relationship and its detection limit

物质	浓度范围/(μg·mL ⁻¹)	线性方程	R^2	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
ATP	2.0~40.0	$Y=59.55X-110.2$	0.993	10	40
ADP	1.703~34.05	$Y=66.94X-17.42$	0.997	1.2	3.8
AMP	3.996~99.90	$Y=82.92X+9.47$	0.999	1.0	3.2
PCr	3.984~498.0	$Y=37.81X+779.8$	0.986	0.8	2.4
Creatinine	1.994~39.88	$Y=117.37X+3.58$	0.998	1.6	4.8

2.3.2 精密度 随机选取6个心肌组织样品(编号分别为1 001、2 004、3 106、4 106、4 108、5 109)混匀进行前处理,按实验室建立的分析方法,按体积比1:1加入0.02 mg/mL混合对照品溶液,样品重复进样6次,用各物质的标准曲线,计算各物质的浓度,用浓度结果计算样品的日内精密度;第2天再重复进样6次,计算各物质的浓度,用12次实验结果计算样品的日间精密度。实验结果表明,除ATP日间精密度3.80%、肌酐的日间精密度4.98%之外,各组分日内、日间精密度均小于2%,说明心肌样品中各能量组分的精密度良好。

2.3.3 回收率 选取3个不同的心肌组织样品溶液进行测定,每个样品各取1/2的量,尽可能均等的分为2份,其中1份加入定量的混合对照品样品,另外1份加入同体积的空白溶液1,两份样品按相同的方法处理、同时分析,计算加标回收率。

同法制备高、中、低3个浓度18份加样回收率

样品。分别加入0.1 mg/mL混合对照品溶液作为高浓度加标溶液,加入0.02 mg/mL混合对照品溶液作为中浓度加标溶液,加入0.004 mg/mL混合对照品溶液作为低浓度加标溶液。

实验结果表明,测得的低、中、高样品各组分的回收率均在85%~115%,回收率均较高。

2.3.4 稳定性 取精密度试验配制的样品溶液,放入样品盘后,按色谱方法,样品盘设置温度为15℃,于15 min、30 min、60 min、3 h、5 h、7 h测定峰面积,考察各目标物的稳定性。结果表明:各目标物峰面积并未明显减少,说明各目标物经强酸处理后,由于溶液中大部分酶被灭活,低温环境下溶液相对稳定。结果如图2所示。

2.4 样品测定结果

通过对各组心肌样品检测,结果显示,附子提取物组、山茱萸提取物组、附子+山茱萸提取物组与模型组比较,ATP、ADP、肌酸、肌酐的含量均升高,

其中,附子+山茱萸提取物组心肌样品中5种能量物质升高显著($P < 0.05, 0.01$)。结果见图3。

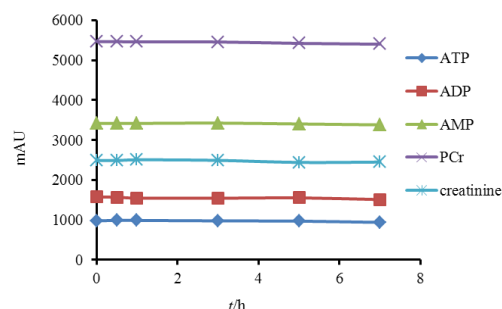
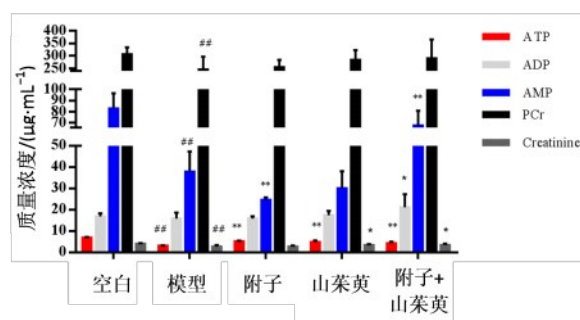


图2 各目标物质稳定性实验结果

Fig. 2 The stability of the target material test results



与空白组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{##}P < 0.01$ vs blank group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

图3 各组别目标物质质量浓度变化情况

Fig.3 Energy metabolite concentration changes

3 讨论与展望

心肌组织中ATP等能量物质容易在各种酶的作用下被破坏,本研究从心肌组织离体后冻存(液氮迅速冷冻, -80°C 冰箱暂存)、样本前处理(预冷处理液、冰水浴下均浆、 4°C 离心)和上机检测(柱温 15°C)全过程、关键实验环节都保持在低温下进行,最大限度地保持心肌组织中能量物质的稳定性,为后续研究奠定物质基础^[2,6]。这也是本研究建立一种HPLC法同时测定大鼠心肌组织中能量代谢物质的含量的前提条件和关键点,其保证了检测结果的准确性和可靠性。

测定细胞的能量物质的方法有酶学法^[8]、毛细管区带电泳法^[9]和荧光检测法^[10]等,本研究建立的液相法与上述方法相比较,简单易行,实验费用低廉,专属性、重复性、精密性、稳定性良好,在检测需要的浓度范围内线性良好。该方法为同时测定心肌组织中ATP、ADP、AMP、PCr、Creatinine的含量提供了简便、快速、可靠的方案;同时也为进一步研究心力衰竭疾病状况下,心肌能量代谢改变的机制研究提供了基础。

本研究应用HPLC法检测大鼠心衰实验中不同给药组动物心肌样品,附子提取物组、山茱萸提取物组、附子+山茱萸提取物组与模型组比较其ATP(及其代谢产物ADP、AMP)、PCr、creatinine等能量物质均有不同程度升高,且附子+山茱萸提取物组比附子提取物组、山茱萸提取物组更为显著,这一结果提示对于慢性心衰大鼠而言,附子+山茱萸联合用药较附子或山茱萸单用,更能有效提高心衰大鼠的心肌活性,其可能与药物促使心肌组织更好的生成和使用ATP、PCr等能量物质有关^[5,7]。

本研究建立了一种准确、简便的测定心肌组织中ATP等能量代谢物质的含量的方法,但其仅直接测定各组别心肌组织中各种能量物质的含量,由于几种能量代谢物质之间转化过程及其机制尚不明确,对于个别能量指标变化尚不能完全解释,比如,ATP、AMP、PCr同时增加,难以完全支持“ATP的生成需消耗ADP、AMP使其含量减少”这一单纯的理论推测,尚需进一步深入研究或结合整体动物实验中其他指标综合考虑。

参考文献

- [1] Ally A, Park G. Rapid determination of creatine, phosphocreatine, purine bases and nucleotides (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP) in heart biopsies by gradient ionpair reversed-phase liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1992, 575(1): 19-27.
- [2] 俞海伦, 韩玉良. 高效液相色谱法同时测定大鼠心肌组织中磷酸肌酸和5种磷酸腺苷的含量 [J]. 应用技术学报, 2017, 03(17): 49-53.
- [3] 孙蕊, 贾鹏禹. 反相高效液相色谱法测定小鼠ATP、ADP和AMP含量及分析 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2012(2): 30-32.
- [4] 陈艳芳, 刘培庆. HPLC测定心肌梗死大鼠磷酸肌酸和ATP的含量 [J]. 今日药学, 2014, 24(11): 771-773.
- [5] 史文静, 周华. 温补心阳和肾阳方对心力衰竭大鼠心功能和心肌磷酸腺苷含量的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(9): 1083-1085.
- [6] 陈兰英, 余曙华, 赵德臻. 液氮冷冻测定大鼠心肌腺三磷及肌酸磷酸方法的初步报告 [J]. 制冷学报, 1981, 3: 63-68.
- [7] Bayeva M, Gheorghiade M, Ardehali H. Mitochondria as a therapeutic target in heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(6): 599-610.
- [8] 何保山, 岳伟伟, 罗金平. 基于生物发光的高灵敏度三磷酸腺苷检测研究 [J]. 分析化学研究简报, 2008, 10(36): 1427-1430.
- [9] 王学艳, 林英. 毛细管区带电泳法测定三磷酸腺苷二钠制剂含量及有关物质 [J]. 中国生化药物杂质, 2001, 22(3): 151-153.
- [10] 苗延虹, 侯法菊. 一种测定三磷酸腺苷二钠的新荧光光度法 [J]. 分析测试学报, 2008, 10(27): 1110-1113.